

(OPEN ACCESS)

Evaluation of nanocapsules containing bacterial metabolites for controlling seafood bacteria at the gene expression level

Mehdi Zolfaghari^{*1}, Shirin Hasani²

1. Corresponding Author, Dept. of Fishery Products Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran and Member of the Research Institute for Development of Marine Based Economy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: zolfaghari.mz@gau.ac.ir
2. Ph.D. Graduate in Fishery Products Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: shirin.hasani88@gmail.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 04.27.2026

Revised: 05.10.2026

Accepted: 05.14.2026

Keywords:

Bacterial metabolites,
Gene expression,
Lipid nanocapsules,
Seafood

ABSTRACT

Background and Objectives: One of the new theories is the control of microorganisms using a self-control mechanism, which is carried out through bacterial signaling metabolites via the quorum sensing process. The aim of this study was to produce nanocapsules containing bacterial supernatant capable of controlled release according to environmental needs to manage bacterial contamination.

Materials and Methods: nanocapsules containing the specific supernatant of lactic acid bacteria, produced during the logarithmic growth phase and the death phase, were prepared. The inhibitory properties of these substances against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* were evaluated using the MIC method. Eventually, the most effective encapsulated supernatant composition was selected against the target bacteria. The expression of a specific virulence gene in *L. monocytogenes* was assessed using real-time PCR. Various characteristics of the nanocapsules, including structure, stability, encapsulation efficiency, and other relevant parameters, were examined. The obtained data were statistically analyzed using SPSS software.

Results: The results showed that the supernatant from lactic acid bacteria in the death phase had the greatest inhibitory effect on the growth of *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, and *L. monocytogenes* ($P < 0.05$). Additionally, the duration of effectiveness of the encapsulated supernatant was significantly longer than that of the non-encapsulated supernatant. Gene expression analysis of *L. monocytogenes* revealed that the virulence gene *hly* was significantly reduced under these conditions but was still expressed.

Conclusion: It can be concluded that the bacterial supernatant contains metabolites capable of controlling microbial growth and reducing it. However, it does not have an effect on controlling the expression of bacterial virulence genes.

Cite this article: Zolfaghari, Mehdi, Hasani, Shirin. 2026. Evaluation of nanocapsules containing bacterial metabolites for controlling seafood bacteria at the gene expression level. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 15 (1), 283-300.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2026.24660.2019

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ارزیابی نانوکپسول‌های حاوی متابولیت باکتریایی، برای کنترل باکتری‌های غذاهای دریایی، در سطح بیان ژن

مهدی ذوالفقاری^{۱*}، شیرین حسینی^۲

۱. نویسنده مسئول، عضو هیأت علمی گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران و عضو پژوهشکده توسعه اقتصاد دریامحور، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: zolfaghari.mz@gau.ac.ir
۲. دانش آموخته دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: shirin.hasani88@gmail.com

| اطلاعات مقاله | چکیده |
|--------------------------------------|---|
| نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی | سابقه و هدف: یکی از تئوری‌های جدید، کنترل میکروارگانیسم‌ها با استفاده از مکانیزم خودکنترلی است که با استفاده از متابولیت‌های حاوی پیغام‌های باکتریایی با فرآیند کیوروم سنسینگ صورت می‌گیرد. تولید نانوکپسول‌های حاوی سوپرناتانت باکتریایی که بتواند رهایش متناسب با نیاز محیط برای کنترل آلودگی‌های باکتریایی داشته باشد از اهداف این پژوهش است. |
| تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۰۷ | مواد و روش‌ها: پس از تولید نانوکپسول‌های حاوی سوپرناتانت ویژه باکتری لاکتیک اسید که در مراحل لگاریتمی رشد و مرحله مرگ باکتریایی تولید شدند، ویژگی‌های کنترل‌کنندگی این مواد روی میکروارگانیسم‌های <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> و <i>Bacillus Cereus</i> با روش MIC مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت بهترین ترکیب سوپرناتانت کپسوله شده روی باکتری‌های هدف انتخاب شد. بررسی بیان ژن ویژه بیماریزایی در باکتری لیستریا با استفاده از روش Real-time PCR صورت گرفت. ویژگی‌های مختلف نانوکپسول‌ها مانند ساختار، پایداری، میزان درون‌پوشانی و سایر موارد لازم مورد بررسی قرار گرفت. |
| تاریخ ویرایش: ۱۴۰۵/۰۲/۲۰ | یافته‌ها: مطابق نتایج سوپرناتانت در مرحله مرگ بیش‌ترین تأثیر را بر کنترل رشد باکتری‌های <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> و <i>L. monocytogenes</i> داشت ($P < 0/05$). هم‌چنین مدت زمان اثرگذاری سوپرناتانت کپسوله شده بسیار طولانی‌تر از سوپرناتانت غیرکپسوله بود. نتایج بررسی بیان ژن باکتری <i>L. monocytogenes</i> نشان داد که ژن بیماریزایی <i>hly</i> در این شرایط کاهش قابل توجهی یافته اما هم‌چنان بیان می‌شود. |
| تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۲۴ | واژه‌های کلیدی: بیان ژن، سوپرناتانت باکتریایی، غذاهای دریایی، نانوکپسول لیپیدی |

نتیجه گیری: سوپرناتانت باکتریایی حاوی متابولیت‌هایی است که قادرند روند رشد میکروبی را کنترل نموده و رشد را کاهش دهند. با این حال تأثیری در کنترل بیان ژن‌های بیماری‌زای باکتری ندارد.

استناد: ذوالفقاری، مهدی، حسنی، شیرین (۱۴۰۵). ارزیابی نانوکپسول‌های حاوی متابولیت باکتریایی، برای کنترل باکتری‌های غذاهای دریایی، در سطح بیان ژن. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۵ (۱)، ۳۰۰-۲۸۳.

Doi: 10.22069/japu.2026.24660.2019



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

محصولات دریایی نقش با اهمیتی در تأمین غذای مردم جهان دارند. این محصولات با توجه به مطلوبیت و برتری غذایی در مقایسه با دیگر منابع پروتئینی، روز به روز مصرف فزون‌تری می‌یابند. ماهی به دلیل داشتن اسیدهای چرب چند غیراشباع و درصد بالای پروتئین، به سرعت در معرض فساد قرار می‌گیرد. فعالیت‌های آنزیمی و میکروبی، سه نوع فساد اصلی شامل فساد اتولیتیکی، فساد باکتریایی و فساد شیمیایی را سبب می‌شوند (۱). واکنش‌های شیمیایی مانند اکسیداسیون چربی به‌ویژه در ماهیان چرب مانند ساردین، قزل‌آلا و کپور علفخوار شایع است و ایجاد بوی تندی در گوشت ماهی می‌کند (۲). اگرچه نگهداری در شرایط سرد و انجماد برای حفظ تازگی ماهیان بهینه است، اما این روش‌ها نمی‌توانند به طور کامل از واکنش‌های میکروبی و شیمیایی کاهش‌دهنده کیفیت جلوگیری کنند (۳).

آلودگی‌های باکتریایی مانند سودوموناس‌ها، اتروباکترها و باکتری‌های اسید لاکتیک از دلایل اصلی فساد فرآورده‌های گوشتی می‌باشند (۴). بسته به منطقه جغرافیایی، بیش از یک چهارم تا یک سوم تولید جهانی گوشت هر ساله در اثر فساد از دسترس خارج می‌شود (۵). افزون بر این، گوشت و فرآورده‌های گوشتی در اثر آلودگی با باکتری‌های بیماری‌زای خطرناکی مانند *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium* (۶) و گونه‌های *Yersinia* باعث ایجاد مسمومیت‌های غذایی و حتی مرگ مصرف‌کنندگان می‌گردند (۷). در این میان، باکتری *L. monocytogenes* به دلیل قدرت بیماری‌زایی و کشندگی بالا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۸). این پاتوژن غذازاد به ویژه در فرآورده‌های دریایی شایع بوده و طبق گزارش‌ها، میزان مرگ و میر در بین افراد مبتلا شده حدود ۳۰ درصد است.

آمارهای معتبر بین‌المللی نشان می‌دهد که فرآورده‌های دریایی آماده مصرف، آلودگی بالایی به این باکتری دارند (۹).

امروزه استفاده از مواد ضد میکروبی شیمیایی مانند نیترات سدیم، پتاسیم هیدروژن سولفات و سدیم بی‌سولفات به منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها متداول شده است (۱۰). اما مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، هزینه‌های بالای این داروها (۱۱) و اثرات سرطان‌زایی نگهدارنده‌های شیمیایی (۱۲) از یک‌سو، و افزایش آگاهی مردم و ایجاد نگرش منفی نسبت به افزودنی‌های سنتتیک از سوی دیگر، تمایل به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی را افزایش داده است (۱۳). مصرف‌کنندگان امروزه ترجیح می‌دهند از نگهدارنده‌های طبیعی به جای انواع مصنوعی استفاده کنند (۱۴).

یکی از رویکردهای نوین در کنترل میکروبی، استفاده از مکانیزم خودکنترلی باکتری‌ها است. سوپرناتانت باکتریایی بسته به مرحله رشد باکتری، حاوی متابولیت‌هایی است که پیغام‌های توقف رشد یا اتولیز را در خود دارند (۱۵). این روش، ویژگی‌های منفی ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را ندارد. با این حال، کاربرد مستقیم این متابولیت‌ها در ماده غذایی ممکن است بر خصوصیات حسی محصول تأثیر بگذارد. افزودن این متابولیت‌ها به درون مواد بسته‌بندی این عیب را کاهش می‌دهد (۱۶).

به منظور افزایش اثربخشی مواد ضد میکروبی، بهتر است آن‌ها درون سیستم‌های نانوحامل ریزپوشانی شوند. در میان انواع سیستم‌های نانوحامل، نانوحامل‌های لیپیدی شامل نانوذرات لیپیدی جامد، نانوساختارهای لیپیدی، نانوامولسیون‌ها و نانولیپوزوم‌ها هستند. لیپوزوم‌ها از خودتجمعی مولکول‌های فسفولیپید در محیط آبی تشکیل می‌شوند؛ سطوح غیرقطبی آن‌ها به سمت همدیگر و سطوح قطبی به سمت محیط آبی

کلکسیون میکروبی معتبر (PTCC) تهیه شد. برای فعال‌سازی، هر سویه به طور جداگانه در محیط کشت مایع مناسب (محیط TSB برای لیستریا و استافیلوکوک و محیط LB برای اشرشیاکلی) تلقیح گردید و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و با دور شیکر ۱۵۰ rpm انکوبه شد (۱۹). پس از انکوباسیون، سوسپانسیون باکتریایی تا غلظت ۰/۵ مگفارلند معادل تقریباً 1×10^8 CFU/mL رقیق گردید. برای آزمون‌های MIC و Real-time PCR، این سوسپانسیون به ترتیب تا غلظت‌های 1×10^6 و 1×10^8 CFU/mL رقیق شد (۲۰).

تولید سوپرناتانت باکتری اسید لاکتیک: باکتری‌های اسید لاکتیک گونه *Lactobacillus plantarum* در محیط MRS broth کشت داده شد (۲۱). نمونه‌برداری در فازهای مختلف رشد (فاز لگاریتمی، فاز سکون و فاز مرگ) انجام گرفت. برای جداسازی سوپرناتانت، محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت حاصل با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر استریل گردید و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (۲۲).

تولید نانوکپسول‌های لیپوزوم با استفاده از هموژنایزر دور بالا

آماده‌سازی فاز لیپیدی: ابتدا مواد لیپیدی شامل فسفولیپید (لسیتین سویا) و کلسترول به نسبت وزنی ۷۰:۳۰ توزین شد. مواد لیپیدی در یک فلاسک بالن ته‌گرد ریخته شده و در حلال آلی کلروفرم حل گردید. برای اطمینان از انحلال کامل، مخلوط به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه با استفاده از همزن مغناطیسی با دور ۳۰۰-۵۰۰ rpm هم زده شد. سپس حلال با استفاده از

قرار می‌گیرد (۱۷). استفاده از ترکیبات کنترل‌کننده رشد باکتریایی در مقیاس نانو می‌تواند ضمن بهبود کیفیت و افزایش عمر ماندگاری گوشت، مضرات نگهدارنده‌های مصنوعی را نداشته باشد.

بیماری‌زایی باکتری *L. monocytogenes* معلول مجموعه‌ای از ژن‌هاست. ژن‌های مسئول بیماری‌زایی در این باکتری به عنوان کلاستر بیماری‌زایی (LIPI-1) شناخته می‌شوند که توسط یک ژن رهبر به نام *prfA* هدایت و تنظیم می‌گردد. ژن *prfA*، ژن‌هایی از جمله *(hly)* کدکننده لیستریولیزین O را تنظیم می‌کند و نقش عمومی در تنظیم هموستاز باکتری دارد (۱۸). بنابراین بررسی میزان بیان این ژن‌ها در مواجهه با ترکیبات ضد میکروبی، شاخص مهمی از کارایی روش‌های کنترلی است.

با وجود پژوهش‌های متعدد در زمینه کنترل میکروبی، تاکنون مطالعه‌ای به بررسی اثر همزمان نانوکپسول‌های سوپرناتانت باکتریایی (به ویژه در فاز مرگ) بر کنترل رشد و نیز بیان ژن‌های بیماری‌زایی *L. monocytogenes* نپرداخته است. مشخص نیست که آیا کپسوله‌سازی این سوپرناتانت‌ها ضمن افزایش رهایش بلندمدت، قادر به مهار ژن‌های بیماری‌زا نیز هست یا خیر. از سوی دیگر، در ایران پژوهشی در زمینه استفاده از نانوحامل‌های لیپیدی حاوی سوپرناتانت باکتری‌های اسید لاکتیک برای کنترل پاتوژن‌های دریایی گزارش نشده است. بر این اساس، هدف این پژوهش طراحی نانوحامل‌های لیپیدی حاوی سوپرناتانت باکتریایی برای کنترل باکتری‌ها در محصولات غذایی دریایی است.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت باکتری‌های هدف: سویه‌های باکتریایی شامل *Escherichia coli*، *Listeria monocytogenes* و *Bacillus cereus* و *Staphylococcus aureus* از

اندازه یکنواخت‌تر و حذف ذرات ریزتر، نمونه از صافی ۰/۲۲ میکرومتر (با اعمال فشار ملایم با استفاده از سرنگ) نیز عبور داده شد (۲۶). نمونه‌های فیلتر شده در ویال‌های دربسته در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمون‌های مشخصه‌یابی نگهداری شدند.

مشخصه‌یابی نانوکپسول‌ها

اندازه ذرات، شاخص پراکندگی (PDI) و پتانسیل زتا: این مشخصه‌ها با استفاده از دستگاه DLS (Dynamic Light Scattering) تعیین گردید (۲۷). مورفولوژی نانوکپسول‌ها با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) با ولتاژ ۸۰ کیلوولت و رنگ‌آمیزی منفی با اورانیل استات ۲ درصد بررسی شد (۲۸). میزان کپسوله‌شدگی (Encapsulation Efficiency) با استفاده از اولترافیلتراسیون- ساترئیفیوژ (با غشای ۱۰ کیلودالتون) و اندازه‌گیری محتوای سوپرناتانت آزاد شده محاسبه گردید (۲۹).

محاسبه کارایی ریزپوشانی (Encapsulation Efficiency)

به روش دیالیز: برای تعیین میزان کپسوله‌شدگی سوپرناتانت درون نانوکپسول‌های لیپوزوم، از روش دیالیز استفاده گردید. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون نانوکپسول‌ها به کیسه دیالیز با غشای ۱۲ کیلودالتون منتقل شد. کیسه دیالیز در بشر حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین PBS، (pH: ۷/۴) در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. بافر دیالیز هر ۸ ساعت یکبار تعویض گردید. پس از ۲۴ ساعت، محتویات داخل کیسه جمع‌آوری شده و نانوکپسول‌ها با افزودن تریتون (X-100 غلظت نهایی ۱ درصد) لیز شدند. غلظت سوپرناتانت آزاد شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۰). میزان کپسوله‌شدگی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$EE\% = (C_{\text{encapsulated}} / C_{\text{total}}) \times 100$$

روتاری اوپراتور در دمای ۴۰-۵۰ درجه سلسیوس و تحت خلأ تبخیر گردید تا یک لایه نازک لیپیدی بر روی دیواره داخلی فلاسک تشکیل شود. لایه لیپیدی به مدت ۳۰ دقیقه تحت خلأ خشک شد تا حلال باقیمانده به طور کامل حذف گردد (۲۳).

هیدراتاسیون لایه لیپیدی: سوپرناتانت باکتریایی (فاز آبی حاوی متابولیت‌های ضد میکروبی) به همراه بافر فسفات سدیم با pH ۷/۴ تا دمای ۶۰ درجه سلسیوس پیش‌گرم گردید. سپس فاز آبی به فلاسک حاوی لایه لیپیدی اضافه شد. مخلوط به آرامی با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد تا لایه لیپیدی به‌طور کامل هیدراته شده و وزیکول‌های لایه‌دار بزرگ (MLVs) تشکیل گردند (۲۴).

کاهش اندازه با هموژنایزر دور بالا: سوسپانسیون حاصل از مرحله هیدراتاسیون به هموژنایزر دور بالا (High Speed Homogeniser) منتقل گردید. هموژنایزر با سرعت ۱۵,۰۰۰ rpm تنظیم شد. فرآیند هموژناسیون در شرایط زیر انجام گرفت: دمای فرآیند در طی هموژناسیون، با استفاده از حمام یخ کنترل و در محدوده ۴-۱۰ درجه سلسیوس نگهداری شد تا از تخریب ترکیبات حساس حرارتی جلوگیری گردد. زمان هموژناسیون نمونه به مدت ۶ دقیقه بود و نمونه به صورت پیوسته تحت برش مکانیکی شدید قرار گرفت. در طی این فرآیند، نیروهای برشی شدید و حفره‌زایی (cavitation) ایجاد شده در شکاف باریک هموژنایزر باعث شکسته شدن وزیکول‌های بزرگ و تشکیل نانوکپسول‌های لیپوزوم با اندازه یکنواخت گردید (۲۵).

فرآیند فیلتراسیون: سوسپانسیون نانوکپسول‌ها پس از هموژناسیون، ابتدا از صافی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد تا ذرات بزرگ، تجمعات لیپیدی و وزیکول‌های هیدراته نشده حذف گردند. سپس برای دستیابی به

روی باکتری‌های هدف *S. aureus*، *E. coli*، *B. cereus* و *L. monocytogenes* با استفاده از روش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) مطابق بخش زیر بررسی گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC): آزمون MIC با استفاده از روش رقت سریال در میکروپلیت (Broth Microdilution) در پلیت‌های ۹۶ خانه انجام شد (۳۴). غلظت‌های مختلفی از سوپرناتانت (اعم از کپسوله‌شده و غیرکپسوله) در چاهک‌های پلیت تهیه گردید. به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با غلظت 1×10^6 CFU/mL اضافه شد. چاهک‌های حاوی محیط کشت بدون باکتری به عنوان کنترل منفی و چاهک‌های حاوی باکتری بدون سوپرناتانت به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، کدورت هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA Reader در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. MIC به‌عنوان کم‌ترین غلظت سوپرناتانتی تعریف گردید که از رشد قابل مشاهده باکتری جلوگیری کرد (۳۵).

بررسی مدت زمان اثرگذاری ضد میکروبی (Time-Kill Assay): برای بررسی مدت زمان اثرگذاری سوپرناتانت نانوکپسوله در مقایسه با نوع غیرکپسوله، آزمون منحنی کشندگی زمانی (Time-Kill) مطابق با دستورالعمل CLSI انجام شد (۳۶). غلظت ۲ برابر MIC از هر دو نمونه (سوپرناتانت غیرکپسوله و نانوکپسوله) به لوله‌های حاوی محیط کشت مایع حاوی باکتری *L. monocytogenes* با غلظت 1×10^6 CFU/mL اضافه گردید. لوله‌های حاوی باکتری بدون افزودن سوپرناتانت به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

که در آن، C_encapsulated غلظت سوپرناتانت کپسوله شده و C_total غلظت کل سوپرناتانت اولیه می‌باشد.

خالص‌سازی نهایی: در صورت نیاز به جداسازی نانوکپسول‌های تشکیل‌شده از سوپرناتانت آزاد، سوسپانسیون با استفاده از اولتراسانتریفیوژ با سرعت ۵۰،۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. رسوب حاوی نانوکپسول‌ها در بافر فسفات سالین بازگردانده شد (۳۱).

ترسیم منحنی رشد و تعیین فازهای مختلف باکتری اسید لاکتیک: به منظور تعیین زمان دقیق فازهای مختلف رشد باکتری اسید لاکتیک، منحنی رشد این باکتری در محیط MRS broth در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ترسیم گردید. نمونه‌برداری از ساعت صفر (زمان تلقیح) آغاز شد و در فواصل ۶۰ دقیقه به مدت ۱۳ ساعت و سپس فواصل ۵ ساعت تا زمان ۳۰ ساعت از شروع کشت، انجام گرفت. کدورت هر نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (۳۲). بر اساس منحنی رشد حاصل، زمان‌های زیر تعیین شد: فاز لگاریتمی (Log phase) از ابتدای رشد تا ۱۲ ساعت پس از کشت، و فاز مرگ (Death phase) پس از ۲۴ ساعت، با شروع کاهش معنی‌دار کدورت (۳۳). سپس باکتری اسید لاکتیک در شرایط یکسان در حجم بیش‌تری کشت داده شد و در زمان‌های متناظر با فاز لگاریتمی (ساعت ۱۰) و فاز مرگ (ساعت ۲۶) نمونه‌برداری انجام گرفت. هر نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل گردید و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (۲۲). اثر هر یک از سوپرناتانت‌های حاصل از مراحل مختلف رشد، بر

د) Real-time PCR: واکنش Real-time PCR با استفاده از SYBR Green Master Mix در دستگاه Real-time PCR (LightCycler 96, Roche) انجام شد (۴۰). پرایمرهای اختصاصی برای ژن *hly* و ژن مرجع *16S rRNA* مطابق منابع انتخاب گردیدند (۴۱، ۴۲) (جدول ۱). آزمایش Real time PCR با استفاده از پروتکل شرکت ارائه دهنده کیت صورت پذیرفت. جهت اجرای آزمون Real time PCR به ترتیب ۵ دقیقه فاز Denaturation اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و سپس ۳۸ سیکل تکراری از ۱۵ ثانیه Denaturation در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۰ ثانیه Annealing در دمای اختصاصی هر ژن و ۴۰ ثانیه Extention در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، سپس یک دوره پایانی ۵ دقیقه‌ای Extension در دمای ۷۲ درجه سلسیوس اجرا شد. در پایان نمودارهای تکثیر و ذوب در تمامی ژن‌های مورد مطالعه بررسی شدند. منحنی ذوب (Melting curve) برای تأیید اختصاصی بودن محصولات PCR ترسیم گردید.

ه) اندازه‌گیری میزان تغییرات بیان ژن: پس از اندازه‌گیری میزان cDNA مرتبط با ژن‌های هدف، میزان بیان ژن خانه‌گردان نیز اندازه‌گیری گردید. برای محاسبه تغییرات بیان ژن از فرمول Pfaffl استفاده شد (۴۳).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_p_{\text{target}} (\text{control} - \text{treated})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_p_{\text{ref}} (\text{control} - \text{treated})}}$$

در این فرمول، Cp نقطه‌ای است که میزان فلورسنس به صورت تصاعدی نسبت به فلورسنس پشت زمینه افزایش می‌یابد و $E = 10^{-1/\text{slope}}$ کارایی واکنش می‌باشد.

تمامی لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. در فواصل زمانی ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، از هر لوله نمونه‌برداری انجام گرفت. هر نمونه در محیط کشت اختصاصی (محیط BHI آگار) کشت سطحی شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، تعداد کلنی‌های زنده (CFU/mL) شمارش گردید (۳۶). هر آزمون در سه تکرار انجام شد.

استخراج RNA و Real-time PCR برای بررسی بیان ژن: برای بررسی بیان ژن *hly* در *Listeria monocytogenes* پس از تیمار با سوپرناتانت، مراحل زیر انجام شد:

الف) تیمار باکتری: باکتری لیستریا در محیط TSB تا فاز لگاریتمی (۰/۵-۰/۶ \approx OD₆₀₀) کشت داده شد (۳۷). سپس غلظت مؤثر سوپرناتانت (کپسوله‌شده) با توجه به آزمون MIC به محیط اضافه گردید و به مدت ۴-۶ ساعت انکوبه شد. باکتری‌های تیمارنشده به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

ب) استخراج RNA: پس از سانتریفیوژ ۱۰ دقیقه، ۴۰۰۰ rpm، ۴ درجه سلسیوس، رسوب باکتری جمع‌آوری گردید. استخراج RNA کل با استفاده از کیت تجاری RNeasy Mini Kit (Qiagen) مطابق دستورالعمل سازنده انجام گرفت (۳۸). برای حذف DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با DNase I تیمار شدند. کمیت و خلوص RNA توسط دستگاه نانودراپ (نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ بین ۱/۸ تا ۲) و کیفیت آن با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تأیید گردید.

ج) سنتز cDNA: از RNA استخراج‌شده، با استفاده از کیت سنتز cDNA (PrimeScript RT Reagent Kit, Takara) و پرایمر الیگو (dT)، cDNA سنتز شد (۳۹).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش.

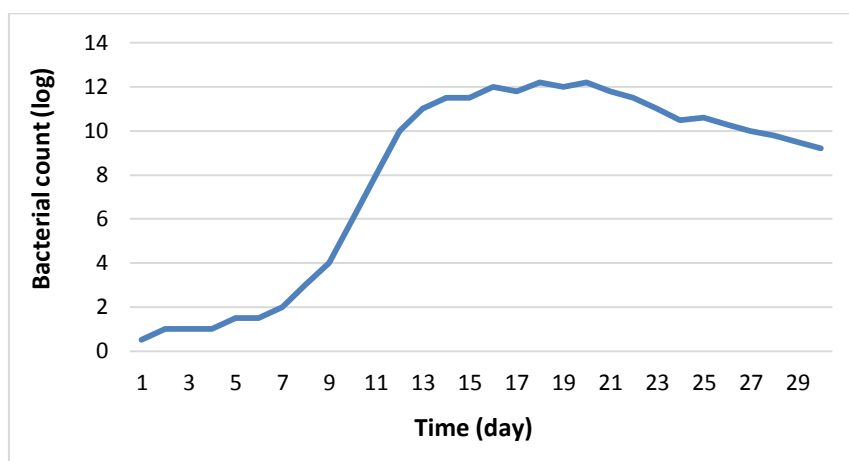
Table 1. Primers used in this study.

| Target Gene | Primer (5 to 3) | Annealing | Product size (bp) |
|-----------------|--|-----------|-------------------|
| <i>16S rRNA</i> | F:TTTAGTTGCCAGCATTAGTTGG R:GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG | 60°C | 109 |
| <i>hly</i> | F: TGCAAGTCCTAAGACGCCA R: CACTGCATCTCCGTGGTATAC TAA | 60°C | 112 |

نتایج و بحث

منحنی رشد باکتری اسید لاکتیک و تعیین فازهای مختلف: نتایج حاصل از کشت باکتری اسید لاکتیک در محیط MRS broth در فواصل زمانی ۱ ساعت به مدت ۳۰ ساعت، در شکل ۱ ارائه شده است. براساس منحنی رشد ترسیم شده، فاز لگاریتمی تا ۱۲ ساعت پس از کشت ادامه یافت و پس از آن باکتری وارد فاز سکون و در ساعت حدود ۲۴ وارد فاز مرگ گردید. بیشترین میزان رشد (اوج کدورت) در ساعت ۱۲ مشاهده شد. از ساعت ۱۲ تا ۲۴ نرخ رشد باکتری ثابت و از ساعت ۲۴ کاهش تدریجی کدورت نشان‌دهنده آغاز فاز مرگ بود.

آنالیز آماری: تمام آزمون‌ها در سه تکرار (n=۳) انجام شدند و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) گزارش گردید. برای مقایسه بین گروه‌ها (سوپرناتانت کپسوله شده در مقابل غیرکپسوله و فازهای مختلف رشد) از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و به دنبال آن آزمون مقایسه‌ای دانکن استفاده شد (۴۴). سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ ($P < 0/05$) در نظر گرفته شد. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام پذیرفت.



شکل ۱- منحنی رشد باکتری *L. Plantarum*

Figure 1. Bacteria growth curve of *L. Plantarum*.

بر اساس نتایج به دست آمده، سوپرناتانت حاصل از فاز مرگ در مقایسه با سوپرناتانت فاز لگاریتمی، اثر مهارکنندگی بیش‌تری بر روی هر چهار باکتری هدف نشان داد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برای سوپرناتانت فاز مرگ در برابر باکتری‌های *E. coli*، *S. aureus*، *B. cereus* و *L. monocytogenes* به ترتیب ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، در حالی که سوپرناتانت فاز لگاریتمی در غلظت‌های مشابه فاقد اثر مهارکنندگی معنی‌دار بود ($P < 0/05$) بیش‌ترین حساسیت به سوپرناتانت فاز مرگ در باکتری *L. monocytogenes* مشاهده گردید.

بر این اساس، زمان‌های ساعت ۱۰ (نزدیک اواخر فاز لگاریتمی) و ساعت ۲۶ (اوایل فاز مرگ) برای نمونه‌برداری سوپرناتانت انتخاب گردیدند. مقایسه اثر مهارکنندگی سوپرناتانت‌های حاصل از فاز لگاریتمی و فاز مرگ: نتایج حاصل از آزمون MIC برای تعیین حساسیت باکتری‌های هدف *E. coli*، *S. aureus*، *B. cereus* و *L. monocytogenes* نسبت به سوپرناتانت‌های حاصل از دو مرحله رشد (فاز لگاریتمی و فاز مرگ) در جدول ۲ ارائه شده است.

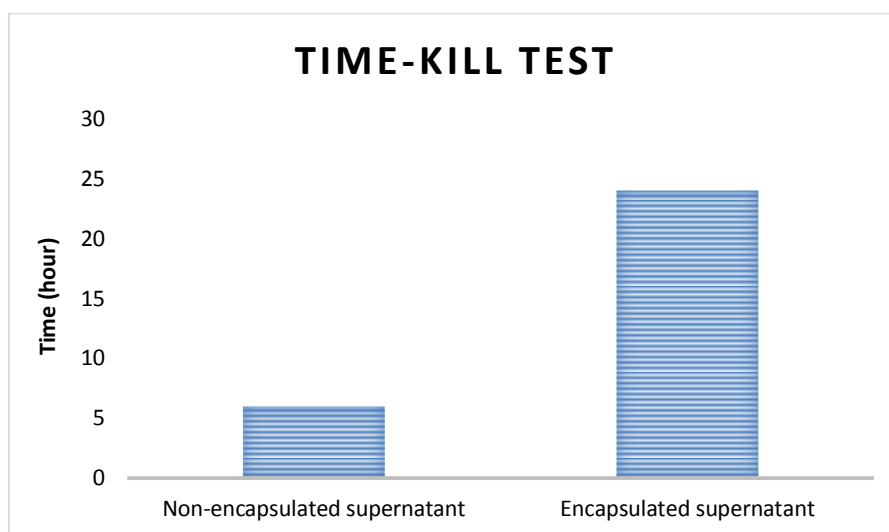
جدول ۲- نتایج MIC برای باکتری‌های هدف با سوپرناتانت‌های مراحل رشد لگاریتمی و مرگ باکتری.

Table 2. MIC results for target bacteria with supernatants of logarithmic growth phases and bacterial death.

| Bacteria | Supernatant log phase (mg/mL) | Supernatant death phase (mg/mL) |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| <i>E. coli</i> | >12.5 | 12.5 |
| <i>S. aureus</i> | >12.5 | 6.25 |
| <i>L. monocytogenes</i> | >12.5 | 3.12 |
| <i>B. cereus</i> | > 12.5 | 6.25 |

با این حال، پس از ۱۲ ساعت، رشد مجدد باکتری آغاز گردید. در مقابل، در نمونه حاوی سوپرناتانت نانوکپسوله، کاهش تدریجی و مستمر جمعیت باکتری تا ۴۸ ساعت ادامه یافت و هیچ‌گونه رشد مجددی مشاهده نگردید. این یافته نشان می‌دهد که نانوکپسوله کردن سوپرناتانت ضمن کاهش شدت اثر فوری، به‌طور قابل‌توجهی مدت زمان اثرگذاری ضد میکروبی را افزایش می‌دهد.

بررسی مدت زمان اثرگذاری سوپرناتانت نانوکپسوله و غیرکپسوله در غلظت ۲ برابر MIC: نتایج حاصل از آزمون منحنی کشندگی زمانی (Time-Kill) برای مقایسه مدت زمان اثرگذاری سوپرناتانت غیرکپسوله و نانوکپسوله در غلظت ۲ برابر MIC در شکل ۲ ارائه شده است. در نمونه حاوی سوپرناتانت غیرکپسوله، کاهش سریع جمعیت باکتری در ۶ ساعت اول مشاهده شد.



شکل ۲- مقایسه زمان مورد نیاز برای کاهش ۹/۹۹ درصد جمعیت باکتری (کاهش ۳ لگاریتمی) در غلظت ۲ برابر MIC نمونه. تیمارها: سوپرناتانت کپسوله و سوپرناتانت غیر کپسوله.

Figure 2. Comparison of the time required to reduce the bacterial population by 99.9% (3-log reduction) at a concentration of 2 times the MIC of the sample. Treatments: Encapsulated supernatant and non-encapsulated supernatant.

پتانسیل زتا برابر $5/2$ - میلی‌ولت اندازه‌گیری شد که بیانگر پایداری فیزیکی مناسب نانوکپسول‌ها است. میزان کپسوله‌شدگی (Encapsulation Efficiency) سوپرناتانت درون نانوکپسول‌های لیپوزوم برابر $65/8$ درصد محاسبه گردید که نشان‌دهنده کارایی مناسب روش تولید می‌باشد (۴۵).

ویژگی‌های نانوکپسول‌های لیپوزوم: نتایج حاصل از مشخصه‌یابی نانوکپسول‌های لیپوزوم حاوی سوپرناتانت فاز مرگ در جدول ۳ ارائه شده است. میانگین اندازه ذرات نانوکپسول‌های تولیدشده با استفاده از هموژنایزر دور بالا برابر $85/3 \pm 1/24$ نانومتر تعیین گردید. شاخص پراکندگی (PDI) برابر $0/26$ محاسبه شد که نشان‌دهنده توزیع یکنواخت ذرات می‌باشد.

جدول ۳- ویژگی‌های نانوکپسول‌های لیپوزوم حاوی سوپرناتانت فاز مرگ.

Table 3. Characteristics of liposome nanocapsules containing death phase supernatant.

| Parameter | Average |
|--|---------|
| اندازه ذرات (nm) Particle size (nm) | 83.5 |
| شاخص پراکندگی (PDI) dispersion index (PDI) | 0.26 |
| پتانسیل زتا (mv) Zeta potential (mv) | -5.2 |
| کارایی کپسوله‌شدگی (EE%) Encapsulation Efficiency (EE%) | 65.8 |

میزان بیان این ژن در نمونه‌های تیمار شده با هر دو نوع سوپرناتانت، تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد ($P < 0.05$) به عبارت دیگر، علی‌رغم این‌که سوپرناتانت‌ها توانستند رشد باکتری *L. monocytogenes* را کنترل کنند، قادر به خاموش کردن یا کاهش بیان ژن بیماری‌زایی *hly* نبودند.

بررسی بیان ژن *hly* در باکتری *Listeria monocytogenes* نتایج حاصل از Real-time PCR برای بررسی بیان ژن (*hly*) کدکننده لیستریولیزین O در باکتری *L. monocytogenes* پس از تیمار با سوپرناتانت نانوکپسوله و غیرکپسوله در جدول ۴ ارائه شده است. براساس نتایج به‌دست آمده، سوپرناتانت غیرکپسوله و نانوکپسوله تأثیری در کاهش بیان ژن *hly* نداشتند.

جدول ۴- میزان بیان نسبی ژن *hly* در *L. monocytogenes* پس از تیمار با سوپرناتانت (روش $\Delta\Delta Ct$).

Table 4. Relative expression level of *hly* gene in *L. monocytogenes* after treatment with supernatant ($\Delta\Delta Ct$ method).

| نمونه Sample | بیان نسبی ژن <i>hly</i> ($\Delta\Delta Ct$) Gene Expression <i>hly</i> ($\Delta\Delta Ct$) | سطح معنی‌داری (P-value) Significant level (P-value) |
|--|---|--|
| کنترل (بدون تیمار) Control | (Reference) 1.00 | - |
| سوپرناتانت غیرکپسوله Non-encapsulated supernatant | 0.95 ± 0.08 | 0.05 > |
| سوپرناتانت نانوکپسوله Capsulated supernatant | 0.97 ± 0.1 | 0.05 > |

سیگنال‌دهنده Autoinducer به نظارت بر تراکم جمعیت خود می‌پردازند (۴۶). زمانی که غلظت این مولکول‌ها به آستانه معینی می‌رسد، بیان ژن‌های هدف شامل فاکتورهای بیماری‌زایی، بیوفیلم و متابولیت‌های ثانویه را فعال می‌کنند (۴۷). در فاز مرگ، باکتری‌های اسید لاکتیک به دلیل لیز سلولی و تجمع بالای پیام‌های جمعیتی، مقادیر قابل توجهی از متابولیت‌های حاوی پیغام‌های توقف رشد و اتولیز را در محیط آزاد می‌کنند (۱۵). این متابولیت‌ها می‌توانند از طریق Quorum Quenching (اختلال در ارتباطات باکتریایی) عملکرد سیستم QS را در باکتری‌های پاتوژن مختل کنند (۴۸). مطالعات نشان داده‌اند که باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از غذاهای تخمیری می‌توانند با تولید متابولیت‌های مهارکننده، تولید ویولاسئین نشانگر

پژوهش حاضر با هدف طراحی نانوکپسول‌های لیپوزومه حاوی سوپرناتانت باکتری اسید لاکتیک و بررسی اثر آن بر کنترل باکتری‌های پاتوژن در محصولات دریایی انجام شد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که سوپرناتانت حاصل از فاز مرگ باکتری اسید لاکتیک در مقایسه با سوپرناتانت فاز لگاریتمی، اثر مهارکنندگی بسیار بیشتری بر روی باکتری‌های هدف *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* و *L. monocytogenes* داشت.

برتری سوپرناتانت فاز مرگ در مهار رشد باکتری‌های هدف را می‌توان به نقش سیستم Quorum Sensing (QS) نسبت داد. Quorum Sensing یک مکانیسم ارتباطی سلول به سلول است که باکتری‌ها از طریق ترشح مولکول‌های

نتایج این پژوهش نشان داد که نانوکپسوله کردن سوپرناتانت در لیپوزوم‌ها منجر به افزایش MIC از ۳/۱۲ به ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *L. monocytogenes* گردید. این یافته با فرضیه پژوهش مبنی بر این که «نانوکپسوله کردن موجب کاهش شدت اثر فوری ضد میکروبی می‌شود» همسو است. این پدیده به دلایل زیر قابل توجیه است: الف) سد فیزیکی لیپوزوم: نانوکپسول‌های لیپوزومه با ایجاد یک سد فیزیکی، آزادسازی تدریجی سوپرناتانت را به همراه دارند و در نتیجه غلظت مؤثر فوری ماده ضد میکروبی در محیط کاهش می‌یابد (۵۳). ب) فعالیت Quorum Sensing در غلظت‌های پایین: مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات اختلال‌دهنده QS معمولاً در غلظت‌های زیر MIC (sub-MIC) نیز فعال هستند (۵۴).

یکی از مهم‌ترین یافته‌های این پژوهش، افزایش چشمگیر مدت زمان اثرگذاری ضد میکروبی در نمونه نانوکپسوله بود. در حالی که سوپرناتانت غیرکپسوله تنها تا ۶ ساعت اثر کشندگی داشت و پس از ۱۲ ساعت رشد مجدد باکتری مشاهده شد، سوپرناتانت نانوکپسوله تا ۲۴ ساعت اثر کشندگی مستمر نشان داد و هیچ‌گونه رشد مجددی رخ نداد. این یافته با فرضیه دوم پژوهش مبنی بر «افزایش مدت اثر ضد میکروبی توسط نانوکپسوله کردن» مطابقت کامل دارد. از منظر Quorum Sensing، این پدیده بدین صورت قابل تبیین است که طی رهایش پایدار، اختلال‌کننده‌های QS نانوکپسول‌ها به عنوان مخازن کوچک عمل کرده و ترکیبات اختلال‌دهنده QS را به تدریج در محیط آزاد می‌کنند. پژوهش عباس و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که لیپوزوم‌های کاتیونی حامل مهارکننده‌های رونویسی می‌توانند با موفقیت سیستم QS را در *Enterococcus faecalis* مهار کرده و بیماری‌زایی را بدون تأثیر بر رشد باکتری کاهش دهند (۵۵).

فعالیت QS را در *Chromobacterium violaceum* کاهش دهند (۴۹).

از سوی دیگر، پژوهش مارکوس و همکاران (۲۰۲۴) با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که پروتئین‌های ترشحی باکتری‌های اسید لاکتیک از جمله *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG و *Lactobacillus acidophilus* NCFM قادر به اتصال به پروتئین‌های AgrB و AgrC در سیستم *L. monocytogenes* هستند و از این طریق می‌توانند ارتباطات باکتریایی این پاتوژن را مختل کنند (۵۰). بنابراین، مکانیسم غالب در برتری فاز مرگ احتمالاً مهار Quorum Sensing پاتوژن‌ها می‌باشد و به خاطر اثر تخریب‌کنندگی مستقیم نمی‌باشد.

در این پژوهش، بیش‌ترین حساسیت به سوپرناتانت فاز مرگ در باکتری *Listeria monocytogenes* با MIC برابر ۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. این حساسیت بالا می‌تواند ناشی از اختلال در سیستم QS اختصاصی لیستریا باشد. *L. monocytogenes* دارای یک سیستم QS از نوع agr است که بیان ژن‌های بیماری‌زایی از جمله *hly* را کنترل می‌کند (۵۱). نکته جالب توجه آن است که پژوهش مصلحی - جنابیان و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که ژن *luxS* درگیر در Quorum Sensing در *Lactobacillus acidophilus* NCFM به‌حضور *L. monocytogenes* و سوپرناتانت عاری از سلول آن، القا می‌شود (۵۲). این یافته نشان می‌دهد که تعامل دوطرفه QS بین باکتری اسید لاکتیک و لیستریا وجود دارد؛ به طوری که حضور لیستریا باعث تحریک سیستم QS در لاکتوباسیلوس شده و در نتیجه تولید متابولیت‌های ضد میکروبی افزایش می‌یابد. حساسیت بالای لیستریا در پژوهش حاضر احتمالاً ناشی از همین تعامل دوطرفه و حساسیت بیش‌تر سیستم agr آن به متابولیت‌های اختلال‌دهنده QS تولید شده در فاز مرگ است.

تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت در ساختار پپتیدهای *autoinducer* یا دامنه اتصال گیرنده‌های *AgrC* باشد. این یافته نشان می‌دهد که اگرچه سوپرناتانت می‌تواند رشد لیستریا را کنترل کند، اما بیماریزایی بالقوه باکتری ممکن است حفظ شود. بنابراین، حذف کامل پاتوژن یا استفاده از روش‌های مکمل برای مهار بیان ژن‌های ویروالانس ضروری به نظر می‌رسد.

مشخصه‌یابی نانوکپسول‌های لیپوزوم نشان داد که روش هموزنایزر دور بالا منجر به تولید نانوکپسول‌هایی با اندازه مناسب (۸۵/۳ نانومتر)، شاخص پراکندگی مطلوب (۰/۲۶) و میزان کپسوله‌شدگی ۶۵/۸ درصد گردید (۴۵). جالب توجه است که لیپوزوم‌ها نه تنها به‌عنوان حامل سوپرناتانت عمل می‌کنند، بلکه پلتفرم‌های مؤثری برای مهار *QS* نیز هستند. پژوهش دینگ و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که سیستم‌های مبتنی بر پروتئولپوزوم می‌توانند برای غربالگری مهارکننده‌های هدفمند سیستم *AgrC* در *QS* باکتریایی استفاده شوند (۵۷). همچنین پژوهش عباس و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که لیپوزوم‌های کاتیونی حامل مهارکننده‌های رونویسی (TFDs) می‌توانند با موفقیت سیستم *QS Fsr* را در *E. faecalis* مهار کنند (۵۵). این یافته‌ها نشان می‌دهد که در پژوهش حاضر نیز نانوکپسول‌های لیپوزوم ممکن است اثر مضاعفی بر مهار *QS* داشته باشند که این مهم از طریق رهایش تدریجی متابولیت‌های اختلال‌دهنده و هم از طریق ایجاد یک پلتفرم پایدار برای تحویل هدفمند این ترکیبات رخ می‌دهد.

با وجود یافته‌های ارزشمند، این پژوهش دارای محدودیت‌هایی نیز بود. بررسی تنها یک ژن بیماریزایی (*hly*) انجام شد. با توجه به یافته‌های مارکوس و همکاران (۲۰۲۴) که نشان داد مهار سیستم *agr* در لیستریا نیازمند هدف‌گیری هم‌زمان *AgrB* و *AgrC* است (۵۰) بررسی ژن‌های درگیر در سیستم

هم‌چنین با جلوگیری از بازسازی جمعیت از طریق مهار مداوم *QS*، توانایی باکتری‌ها برای برقراری ارتباط، تشکیل بیوفیلم و بیان فاکتورهای بیماریزایی به‌طور مستمر مختل می‌شود.

عدم کاهش بیان ژن *hly* نشان می‌دهد که مکانیسم اثر سوپرناتانت فاز مرگ عمدتاً از طریق مهار رشد باکتری بوده و از طریق سرکوب فاکتورهای ویروالانس نمی‌باشد. عدم تأثیر سوپرناتانت (چه کپسوله و چه غیرکپسوله) بر بیان ژن *hly* در باکتری *L. monocytogenes* نتیجه جالب توجهی است. این یافته در نگاه اول با پژوهش‌های اخیر در تضاد به نظر می‌رسد. به‌عنوان مثال، پژوهش مارکوس و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که پروتئین‌های ترشحی باکتری‌های اسید لاکتیک پتانسیل اتصال به *AgrB* و *AgrC* در سیستم *agr* لیستریا را دارند و می‌توانند ارتباطات باکتریایی را مختل کنند (۵۰). اما دلایل قابل‌توجهی برای این موضوع وجود دارد. اول این‌که کاست ژنی *LIP1-1* شامل *hly* و *prfA* ممکن است در محیط کشت استاندارد (*in vitro*) از مکانیسم‌های تنظیمی مستحکمی برخوردار باشد که در برابر غلظت‌های پایین متابولیت‌های اختلال‌دهنده *QS* مقاوم هستند (۱۸). دوم این‌که بر خلاف سیستم *agr* در *S. aureus* که به پپتیدهای ترشحی حساس است، مهار ژن *hly* در *L. monocytogenes* ممکن است نیازمند غلظت‌های بالاتری از متابولیت‌های اختلال‌دهنده باشد. سوم این‌که تفاوت‌های ساختاری قابل‌توجهی وجود دارد. در حالی‌که پژوهش پنگ و همکاران (۲۰۲۵) نشان داد که سویه‌های *Lactobacillus paraplantarum* می‌توانند از طریق سیستم *agr-like* خود، *QS* و تولید همولیزین در *S. aureus* را مهار کنند (۵۶)، سیستم *agr* در *L. monocytogenes* ممکن است تفاوت‌های ساختاری قابل‌توجهی داشته باشد که آن را در برابر متابولیت‌های باکتری اسید لاکتیک مقاوم‌تر می‌کند. این

سیستم ضد میکروبی مؤثر با رهایش طولانی مدت برای کنترل باکتری‌های پاتوژن در مواد غذایی دریایی مورد استفاده قرار گیرند. هم‌چنین این نتایج می‌تواند کارایی استفاده از مکانیسم Quorum Sensing را برای مهار رشد باکتری‌ها در فرآورده‌های غذایی مورد تأیید قرار دهد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای حمایت مالی این پژوهش و همه عزیزانی که در انجام پژوهش همکاری نمودند قدردانی می‌گردد. این مقاله مستخرج از نتایج طرح پژوهشی شماره ۲۲-۴۸۶-۰۲ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان می‌باشد.

agr مانند *agrB*, *agrC* و ژن‌های کدکننده AI پیتید می‌توانست اطلاعات جامع‌تری ارائه دهد. تمام آزمون‌ها در محیط *in vitro* انجام شد. پژوهش پلیانتا و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که اثر ضد لیستریایی سویه‌های اسید لاکتیک در مدل غذایی (شیر کامل) با شرایط آزمایشگاهی متفاوت است و ماتریکس غذایی می‌تواند بر فعالیت متابولیت‌ها تأثیر بگذارد (۵۸). هم‌چنین در این پژوهش، اثر مستقیم سوپرناتانت بر تولید AI-2 به عنوان شاخص QS بین گونه‌ای اندازه‌گیری نشد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که نانوکپسول‌های لیپوزوم حاوی سوپرناتانت فاز مرگ باکتری اسید لاکتیک می‌توانند به عنوان یک

منابع

1. Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165-199.
2. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
3. Huss, H. H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish* (FAO Fisheries Technical Paper No. 348). FAO.
4. Undeland, I. (2016). Lipid oxidation in fish: Mechanisms and implications for food quality. In *Lipid Oxidation in Food and Biological Systems* (pp. 123-145). Springer.
5. Sakanaka, S., Tachibana, Y., & Okada, S. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 89(4), 569-575.
6. Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2022). *Listeria monocytogenes*: A foodborne pathogen. *Food Science and Human Wellness*, 11(4), 789-798.
7. Wang, Z., Chen, Y., Liu, X., & Zhang, W. (2022). *Yersinia enterocolitica* in food. *Food Microbiology*, 101, 103891.
8. Belias, A., Aguirre Sanchez, L., Bergholz, T. M., & Wiedmann, M. (2022). *Listeria monocytogenes* virulence factors. *Microorganisms*, 10(2), 342.
9. Shan, Y., Liu, X., Wang, J., & Sun, Z. (2012). *Listeria monocytogenes* in seafood. *Food Control*, 23(1), 7-13.
10. Dey, S., Nagababu, B. H., & Mandal, S. (2022). Chemical preservatives in food. *Food Chemistry*, 380, 132168.
11. Zhang, L., Wang, Y., & Li, J. (2022). Antibiotic resistance and cost analysis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 28, 45-52.
12. Soni, A., Brightwell, G., & Gupta, S. (2022). Carcinogenic effects of synthetic preservatives. *Food and Chemical Toxicology*, 160, 112808.
13. Andre, S., Vallgård, S., & Jensen, J. D. (2022). Consumer attitudes toward natural preservatives. *Food Quality and Preference*, 96, 104420.

14. Sathivel, S., Yin, H., Bechtel, P. J., & King, J. M. (2007). Natural preservatives in seafood. *Journal of Food Science*, 72(9), 139-146.
15. Saikia, D., & Badwaik, L. S. (2018). Bacterial supernatant as antimicrobial agent. *Journal of Applied Microbiology*, 125(3), 632-643.
16. Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., & Mirmoghtadaie, L. (2009). Incorporation of metabolites into food packaging. *Packaging Technology and Science*, 22(7), 371-382.
17. Hamdi, M., Nasri, R., & Nasri, M. (2015). Liposomal nanocarriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 133, 99-108.
18. Rayser, I. (2007). PrfA and virulence gene regulation in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(6), 401-408.
19. CLSI. (2018). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M07-A11*. Clinical and Laboratory Standards Institute.
20. Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5-16.
21. De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.
22. Kuddus, M. (2019). *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press.
23. Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238-252.
24. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102.
25. Thompson, A. K., & Singh, H. (2006). Preparation of liposomes by high-shear homogenization. *International Journal of Pharmaceutics*, 312(1-2), 182-188.
26. Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J., & Papahadjopoulos, D. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 557(1), 9-23.
27. Malvern Instruments. (2015). *Dynamic Light Scattering: Basic Principles*. Malvern Instruments.
28. Chen, C. Y., & Cheng, Y. C. (2018). TEM analysis of nanoparticles. *Materials Today*, 21(6), 593-610.
29. Mehta, D. (2016). Ultrafiltration for liposome encapsulation efficiency. *Journal of Liposome Research*, 26(2), 145-152.
30. Mauro, J. M., Bianco, M., Cravotto, G., & Robaldo, B. (2019). Dialysis method for encapsulation efficiency determination. *International Journal of Pharmaceutics*, 560, 1-9.
31. Torchilin, V. P. (2005). *Liposomes: A Practical Approach*. Oxford University Press.
32. Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3(1), 371-394.
33. Hall, B. G., Acar, H., & Nandipati, A. (2014). Growth rates of bacteria. *Journal of Bacteriology*, 196(14), 2709-2719.
34. Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175.
35. CLSI. (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M07-A10*. Clinical and Laboratory Standards Institute.
36. CLSI. (1999). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Standard M26-A*. Clinical and Laboratory Standards Institute.
37. Neidhardt, F. C. (1996). *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press.
38. Qiagen. (2012). *RNeasy Mini Handbook*. Qiagen.

39. Takara Bio. (2015). *PrimeScript RT Reagent Kit User Manual*. Takara Bio Inc.
40. Roche. (2014). *LightCycler 96 Instrument Operator's Guide*. Roche Diagnostics.
41. Duodu, S., Holst-Jensen, A., Skjerdal, T., Cappelier, J. M., Pilet, M. F., & Loncarevic, S. (2010). Influence of storage temperature on gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains grown in a salmon matrix. *Food Microbiology*, 27(6), 795-801.
42. Tan, Q., Xu, H., Chen, T., Li, P., Aguilar, Z. P., Xu, D., Dong, Y., & Wei, H. (2012). Differential expression of virulence and stress fitness genes during interaction between *Listeria monocytogenes* and *Bifidobacterium longum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(4), 699-704.
43. Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In *A-Z of Quantitative PCR* (pp. 89-113). International University Line.
44. SPSS Inc. (2019). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0*. IBM Corp.
45. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
46. Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319-346.
47. Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a012427.
48. Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., & Faure, D. (2016). Quorum quenching: Role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 86-116.
49. No authors listed. (2026). Evaluation of quorum quenching activity of lactic acid bacteria isolated from fermented foods via *Chromobacterium violaceum* biosensor. *PubMed*. PMID: 41027658.
50. Marques, P. H., Lima, T. C., Silva, M. R., Oliveira, J. R., & Santos, V. L. (2024). Lactic acid bacteria secreted proteins as potential *Listeria monocytogenes* quorum sensing inhibitors. *Molecular Diversity*. <https://doi.org/10.1007/s11030-023-10688-w>.
51. Pang, X., Wang, Y., Feng, Z., Xu, R., Sun, J., Li, X., Lu, Y., & Yuk, H. G. (2025). Quorum sensing in *Listeria monocytogenes* and control strategies for its inhibition in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 447, 111518. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111518>.
52. Moslehi-Jenabian, S., Gori, K., & Jespersen, L. (2011). The quorum sensing luxS gene is induced in *Lactobacillus acidophilus* NCFM in response to *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 269-273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.011>.
53. Cui, H. S., Wu, Z. R., Shi, X. Y., Wang, Y., Zhang, L., & Li, J. (2024). CS/PVP hydrogel-based nanocapillary for monitoring bacterial growth and rapid antibiotic susceptibility testing. *ACS Sensors*. <https://doi.org/10.1021/acssensors.4c00381>.
54. O'Loughlin, C. T., Miller, L. C., Siryaporn, A., Drescher, K., Semmelhack, M. F., & Bassler, B. L. (2013). A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(44), 17981-17986.
55. Abbas, H. A., Shaldam, M. A., & El-Ganiny, A. M. (2024). Development of a transcription factor decoy-nanocarrier system as a successful inhibitor of *Enterococcus faecalis* virulence in vitro and in vivo. *PubMed*. PMID: 38936638.

56. Peng, X., Zhang, Y., & Liu, H. (2025). Characterization of agr-like loci in *Lactiplantibacillus plantarum* and *L. paraplantarum* and their role in quorum sensing and virulence inhibition of *Staphylococcus aureus*. *PubMed*. PMID: 39966225.
57. Ding, Y., Zhao, J., & Zhang, X. (2019). Proteoliposome-based model for screening inhibitors targeting histidine kinase AgrC. *Chemical Biology & Drug Design*. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13453>.
58. Pelyuntha, W., Chaiyasut, C., Kantachote, D., & Sirilun, S. (2021). Comprehensive molecular, probiotic, and quorum-sensing characterization of anti-listerial lactic acid bacteria, and application as bioprotective in a food (milk) model. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 6516-6534. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19034>.